

# バイオフィーム構成菌に関する基礎的研究

## *Basic studies on bacteria constituting biofilms*

古畑勝則, 福山正文

麻布大学大学院環境保健学研究科

Katsunori Furuhashi, Masahumi Fukuyama

School of Environmental Health, Azabu University

**Abstract:** We measured the number of bacteria in biofilms occurring in cooling towers in Tokyo with respect to nutrients in medium and days of culture, and observed rapidly growing bacterial species forming colonies after 2 days even in media with a high nutrient value such as BHI agar medium. Based on the partial base sequence of 16S rDNA, the bacterial species were identified as *P.mosselii*, *P.alkaligenes*, and *P.alcaliphila*. The absorbance of staining solution after staining of these isolates ranged from 0.44 for *Microbacterium* sp. to 10.10 for *Sphingomonas acromaticivorans/subterranea*, showing biofilm formation of all isolates. Biofilm formation differed among bacterial strains. However, biofilm formation was slightly higher in strains isolated in 1/100 medium.

### 序 文

近年、環境衛生や食品などの製造分野において「バイオフィーム」という単語を見聞きする機会が多くなった。一方、医療や医学の分野では古くからバイオフィーム感染症として知られていたが、易感染者の増大により難治感染症としてクローズアップされている。また、バイオフィームは、衛生工学や製紙工業などの特定の分野ではスライムと称され、さらに一般にはヌメリ、ヌルヌルなどと言われている。

一般の住環境においても特に湿度が高い浴室や洗面所、台所等の水周りでは淡紅色を呈するヌルヌルしたバイオフィームが方々で問題視されている。人々の生活水準の向上にともない、アメニティー、すなわち「快適性」という概念が広まり、限られた居住空間でできるだけ気持ちよく、清潔に生活したいとの意識が高まってきた。こうした居住者の意識

変化を反映して、居住環境で発生したバイオフィームの外観や感触から不快感を生じ、建築、施工者を相手に訴訟問題にまで発展した事例もある。

これまでバイオフィームは一つの現象としてとらえられており<sup>1-5)</sup>、構成微生物に関する詳細な検討は、まだ始まったばかりと言っても過言ではなく、今後解明されるべき課題は山積みである。そこで今回は、冷却塔に発生したバイオフィームを材料にこれまでとは違った微生物生態学的視点からバイオフィーム構成菌の解析を行った。

### 材料および方法

#### 1. 供試試料

都内の冷却塔に発生したバイオフィームをミクロスパーテルでかき取り、冷却水に入れて搬入した。これを肉眼的に観察した後、滅菌生理食塩水で軽く遠心（1,000 rpm, 3分間）してバイオフィームを洗

浄後、ボルテックスミキサーで激しく振とうして可能な限り均一に分散させて測定材料とした。

2. バイオフィルムの菌数測定

構成菌数の測定には、BHI寒天培地（DB）と、これを1/10、1/100、1/1,000に希釈した培地、さらにR2A培地（日本製薬）の計5種類を用いた。10倍段階で希釈した供試試料を各培地に0.1 mlずつ塗抹し、25℃で培養しながら経日的に出現集落を計数した。

3. 構成菌種の同定

既報<sup>6)</sup>と同様に、16S rDNAの部分塩基配列を基に分離株の菌種同定を行った。

4. 構成菌のバイオフィルム形成能

分離株のバイオフィルム形成能を検討するために、96穴平底マイクロプレートにR2Aブロス（日本製薬）を0.2 mlずつ分注し、菌株を接種した。これを25℃で7日間静置培養し、ウェル内にバイオフィルムを形成させた。このバイオフィルムを0.1%クリスタルバイオレッド溶液で3分間染色後、95%エタノール0.2 mlで抽出し、溶出した色素の吸光度を波長570 nmで測定し、その強弱からバイオフィルム形成能を比較した。

成 績

1. バイオフィルムの構成菌数

結果はTable 1に示したとおりである。上段のAバ

イオフィルムについてみると、培養2日目でBHI寒天培地において10<sup>3</sup>CFUの集落が出現した。また、1/10培地、R2A培地でも同等の菌数であった。しかし、1/100培地と1/1,000培地では集落の形成は認められなかった。5日目になると、1/100培地で10<sup>7</sup>CFU、1/1,000培地で10<sup>6</sup>CFUの集落が形成され、他の培地ではいずれも10<sup>6</sup>CFUの集落が認められた。7日目では1/10培地で菌数が10<sup>7</sup>CFUに増加したが、その他の培地では顕著な増加は認められなかった。その後10日目、14日目でも菌数の増加はほとんどなく、7日目の菌数と大差なかった。

また、下段に示したBバイオフィルムでは、培養2日目で1/1,000培地を除くすべての培地で集落形成がみられ、その菌数はBHI寒天培地では10<sup>4</sup>CFU、1/10培地、1/100培地およびR2A培地ではそれぞれ10<sup>5</sup>CFUであった。5日目になると、1/1,000培地でも10<sup>5</sup>CFUの集落が形成され、その他の培地では菌数の大きな増加はなかった。その後、7日、10日、14日を経過してもすべての培地において菌数の増加はみられなかった。

2. バイオフィルムの構成菌種

結果をTable 2に示した。上段のAバイオフィルムについてみると、培養2日目でBHI寒天培地、1/10培地およびR2A培地により分離された菌種はいずれも*Pseudomonas mosselii*であった。また、7日目に集

Table 1. The counts of colonies in the biofilm samples under the various culture conditions.

A biofilm					
Culture time (days)	Media				
	BHI	1/10BHI	1/100BHI	1/1,000BHI	R2A
2	6.4 × 10 <sup>3</sup> *	6.7 × 10 <sup>3</sup>	—	—	3.0 × 10 <sup>3</sup>
5	1.3 × 10 <sup>6</sup>	8.0 × 10 <sup>6</sup>	1.6 × 10 <sup>7</sup>	1.2 × 10 <sup>6</sup>	1.7 × 10 <sup>6</sup>
7	1.5 × 10 <sup>6</sup>	1.3 × 10 <sup>7</sup>	1.7 × 10 <sup>7</sup>	2.9 × 10 <sup>6</sup>	2.9 × 10 <sup>6</sup>
10	1.8 × 10 <sup>6</sup>	1.7 × 10 <sup>7</sup>	1.8 × 10 <sup>7</sup>	6.3 × 10 <sup>6</sup>	3.9 × 10 <sup>6</sup>
14	1.9 × 10 <sup>6</sup>	1.9 × 10 <sup>7</sup>	2.5 × 10 <sup>7</sup>	8.0 × 10 <sup>6</sup>	5.0 × 10 <sup>6</sup>

  

B biofilm					
Culture time (days)	Media				
	BHI	1/10BHI	1/100BHI	1/1,000BHI	R2A
2	6.0 × 10 <sup>4</sup> *	3.4 × 10 <sup>5</sup>	2.4 × 10 <sup>5</sup>	—	1.8 × 10 <sup>5</sup>
5	6.0 × 10 <sup>4</sup>	3.8 × 10 <sup>5</sup>	3.0 × 10 <sup>5</sup>	3.0 × 10 <sup>5</sup>	2.8 × 10 <sup>5</sup>
7	6.0 × 10 <sup>4</sup>	4.2 × 10 <sup>5</sup>	7.2 × 10 <sup>5</sup>	4.4 × 10 <sup>5</sup>	3.6 × 10 <sup>5</sup>
10	6.0 × 10 <sup>4</sup>	4.4 × 10 <sup>5</sup>	7.2 × 10 <sup>5</sup>	4.4 × 10 <sup>5</sup>	3.6 × 10 <sup>5</sup>
14	6.0 × 10 <sup>4</sup>	4.4 × 10 <sup>5</sup>	7.2 × 10 <sup>5</sup>	4.4 × 10 <sup>5</sup>	3.6 × 10 <sup>5</sup>

\* : CFU/0.1ml  
— : Uncalculable

Table 2. Heterotrophic bacteria isolated from the biofilm samples under the various culture conditions.

A biofilm					
Culture time	Media				
(days)	BHI	1/10BHI	1/100BHI	1/1,000BHI	R2A
2	<i>Pseudomonas mosselii</i>	<i>Pseudomonas mosselii</i>	—	—	<i>Pseudomonas mosselii</i>
7	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Microbacterium</i> sp. <i>Microcella putealis</i> <i>Porphyrobacter donghaensis</i> <i>Micrococcus luteus</i>	<i>Erythromicrobium</i> sp. <i>Sandaracinobacter sibiricus</i> <i>Terrimonas</i> sp.	<i>Microbacterium</i> sp. <i>Erythromicrobium</i> sp.	<i>Microbacterium</i> sp. <i>Erythromicrobium</i> sp.
14	<i>Yonghaparkia alkaliphila</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Microcella</i> sp.	<i>Sandaracinobacter sibiricus</i> <i>Roseomonas</i> sp.	<i>Microcella</i> sp. <i>Microbacterium</i> sp.
B biofilm					
Culture time	Media				
(days)	BHI	1/10BHI	1/100BHI	1/1,000BHI	R2A
2	<i>Pseudomonas alkaligenes</i> <i>Pseudomonas alcaliphila</i>	<i>Pseudomonas alkaligenes</i> <i>Acidovorax temperans</i> <i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas alkaligenes</i> <i>Pseudomonas alcaliphila</i>	—	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> <i>Acidovorax temperans</i> <i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>
7	—	<i>Herbaspirillum</i> sp.	<i>Sphingomonas</i> sp. <i>Sphingopyxis wittflariensis</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. <i>Methylophilus methylotrophus</i>	<i>Methylophilus methylotrophus</i> <i>Methyloversatilis</i> sp. <i>Mycobacterium chubuense</i>

—: Nonisolation

落を形成した貧栄養細菌では、*Microbacterium* sp.や*Erythromicrobium* sp.が共通して分離された。なかでも、1/10 培地での分離菌種数が最も多く、*Microbacterium* sp.の他、*Microcella putealis*, *Porphyrobacter donghaensis* および *Micrococcus luteus* が同定された。次に 1/100 培地において 3 菌種が分離されており、*Erythromicrobium* sp.の他に *Sandaracinobacter sibiricus* と *Terrimonas* sp.であった。14 日目の分離菌種は、BHI 寒天培地において *Yonghaparkia alkaliphila* が同定された。また、1/10 培地では *Staphylococcus capitis*, 1/100 培地では *Microcella* sp., 1/1,000 培地では *Sandaracinobacter sibiricus* と *Roseomonas* sp., R2A 培地では *Microcella* sp.と *Microbacterium* sp.がそれぞれ分離された。

また、下段に示した B バイオフィームでは、培養 2 日目に 1/1,000 培地を除く各培地で分離された菌種は、*Pseudomonas alkaligenes* と *Pseudomonas alcaliphila* が共通していた。さらに、1/10 培地では *Acidovorax temperans* と *Sphingomonas* sp., また R2A 培地では *Acidovorax temperans* と *Pseudoxanthomonas japonensis* が同定された。7 日目に集落を形成した貧栄養細菌では、*Sphingomonas* sp.と *Methylophilus methylotrophus* が共通していた。このほか、1/10 培地では *Herbaspirillum* sp., 1/100 培地では *Sphingopyxis wittflariensis*, R2A 培地では *Methyloversatilis* sp.と *Mycobacterium chubuense* がそれぞれ分離同定された。

### 3. 構成菌株のバイオフィーム形成能

結果は培養日数と分離培地とともに Table 3 に示した。まず、A バイオフィームでは、*Microbacterium* sp. (A-11 株, A-23 株) の 0.44 ~ *Sandaracinobacter sibiricus* (A-8 株) の 4.99 の範囲で、平均 1.28 であり、いずれの分離株でもバイオフィーム形成が認められた。これを培養日数ごとの平均値でみると、2 日目の分離株では 1.06, 7 日目の分離株では 1.60, 14 日目の分離株では 0.70 であり、やや 7 日目の分離株で形成能が高かった。また、分離培地ごとの平均値でみると、BHI, 1/10, 1/100, 1/1,000, R2A では、それぞれ 0.94, 1.78, 1.81, 0.86, 0.85 であり、1/100 培地での分離株のバイオフィーム形成能がやや高かった。

一方、B バイオフィームでは、*Pseudomonas alkaligenes* (B-3 株) の 0.55 ~ *Sphingomonas aromaticivorans/subterranea* (B-12 株) の 10.10 の範囲で、平均 2.73 であり、B バイオフィーム構成菌のバイオフィーム形成能は、A バイオフィーム構成菌よりも 2 倍以上高かった。これを培養日数ごとの平均値でみると、2 日目の分離株では 2.09, 7 日目の分離株では 3.44 であり、増殖速度の遅い分離株の方がバイオフィーム形成能は高かった。また、分離培地ごとの平均値でみると、BHI, 1/10, 1/100, 1/1,000, R2A では、それぞれ 3.36, 2.86, 4.13, 2.31, 1.72 であり、1/100 培地での分離株のバイオフィーム形成能が最も高く、この傾向は A バイオフィームの場合と

Table 3. Absorbance of isolates by the biofilm formation.

A biofilm				
Strain no.	Culture time	Media	Species	Absorbance
A-1	2	BHI	<i>Pseudomonas mosselii</i>	0.76
-2	2	1/10BHI	<i>Pseudomonas mosselii</i>	1.35
-3	7	BHI	<i>Microbacterium</i> sp.	1.48
-4	7	1/10BHI	<i>Microcella putealis</i>	0.68
-5	7	1/10BHI	<i>Micrococcus luteus</i>	1.97
-6	7	1/10BHI	<i>Microbacterium</i> sp.	0.78
-7	7	1/10BHI	<i>Porphyrobacter donghaensis</i>	4.83
-8	7	1/100BHI	<i>Sandaracinobacter sibiricus</i>	4.99
-9	7	1/100BHI	<i>Erythromicrobium</i> sp.	1.16
-10	7	1/100BHI	<i>Terrimonas</i> sp.	0.56
-11	7	1/1,000BHI	<i>Microbacterium</i> sp.	0.44
-12	7	1/1,000BHI	<i>Erythromicrobium</i> sp.	1.51
-13	7	1/1,000BHI	<i>Microbacterium</i> sp.	0.62
-14	7	R2A	<i>Microbacterium</i> sp.	0.88
-15	7	R2A	<i>Microbacterium</i> sp.	0.65
-16	7	R2A	<i>Erythromicrobium</i> sp.	1.79
-17	14	BHI	<i>Yonghaparkia alkaliphila</i>	0.57
-18	14	1/10BHI	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.09
-19	14	1/100BHI	<i>Microcella</i> sp.	0.54
-20	14	1/1,000BHI	<i>Roseomonas</i> sp.	0.63
-21	14	1/1,000BHI	<i>Sandaracinobacter sibiricus</i>	1.13
-22	14	R2A	<i>Microcella</i> sp.	0.51
-23	14	R2A	<i>Microbacterium</i> sp.	0.44

  

B biofilm				
Strain no.	Culture time	Media	Species	Absorbance
B-1	2	BHI	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	6.09
-2	2	BHI	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	0.63
-3	2	1/10BHI	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0.55
-4	2	1/10BHI	<i>Acidovorax temperans</i>	1.30
-5	2	1/10BHI	<i>Sphingomonas</i> sp.	4.48
-6	2	1/100BHI	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	0.64
-7	2	1/100BHI	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0.75
-8	2	R2A	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	0.71
-9	2	R2A	<i>Acidovorax temperans</i>	3.82
-10	2	R2A	<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>	1.98
-11	7	1/10BHI	<i>Herbaspirillum</i> sp.	5.11
-12	7	1/100BHI	<i>Sphingomonas aromaticivorans / subterranea</i>	10.1
-13	7	1/100BHI	<i>Sphingopyxis witflariensis</i>	5.02
-14	7	1/1,000BHI	<i>Sphingomonas</i> sp.	5.41
-15	7	1/1,000BHI	<i>Methylophilus methylotrophus</i>	0.94
-16	7	1/1,000BHI	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	0.59
-17	7	R2A	<i>Methylophilus methylotrophus</i>	1.90
-18	7	R2A	<i>Mycobacterium chubuense</i>	0.58
-19	7	R2A	<i>Methyloversatilis</i> sp.	1.36

同様であった。このように、バイオフィーム形成能は菌株によって異なり、菌種による強弱の傾向はみられなかった。

考 察

住環境の水周りに発生するバイオフィームは、いわゆる水垢であり、細菌の増殖により自然に発生す

るものである。何気なく見過ごしてしまえば気にならないものであるが、最近、度々話題になるのは建築様式の近代化により住環境に変化が生じたためバイオフィームが多発するようになったのか、あるいは、日々の生活を快適な住環境の中で過ごそうという意識が高まり、そのため今まで以上に注意深く観察するようになったためであろうか。いずれにしろ、

バイオフィルムに対して関心が高まってきているのは事実である。今後は何らかの対応策を講ずる必要があるが、相手が微生物の集合体であるだけに容易に制御することは困難であり、大きな課題である。

今回の検討により、BHI 寒天培地のような栄養価の高い培地でも2日後に集落を形成できるような増殖速度の速い菌種がバイオフィルム構成菌として生息していることが初めて明らかになった。従来、バイオフィルム構成菌の測定方法として用いられてきた貧栄養細菌の測定方法では、試料の希釈や長時間の培養などにより、記述したAバイオフィルムのような場合では、これらの増殖速度の速い菌種は測定対象から除外されていたものと考えられた。

また、今回分離同定された貧栄養細菌は、これまでバイオフィルム構成菌としては、ほとんど報告されていない菌種であった<sup>7)</sup>。このことは、今回の同定は16S rDNAの部分塩基配列を基に行ったためと考えられた。これら分離株のうち、種まで同定困難な株や塩基配列の相同性から新種と思われる菌株が多くあり、今後の分類に関する情報の蓄積が不可欠であると考えられた。

今回の検討結果から、富栄養培地で2日目に集落を形成できるような増殖速度の早い構成菌は、*P.mosselii* (Aバイオフィルム) や *P.alkaligenes* と

*P.alcaliphila* (Bバイオフィルム) であることが明らかになり、いずれも *Pseudomonas* 属であったことに注目したい。

## 結 語

今回の検討により、冷却塔に発生したバイオフィルムでは、富栄養培地で比較的短時間に集落を形成できる菌種も構成菌種の一員であることが初めて明らかになった。しかし、これら分離株のバイオフィルム形成とその維持における役割や他の菌株との相互作用などはまったく未知の状態である。今後、こうしたことが明らかになればバイオフィルム形成抑制においても得策が見つかるかもしれない。

## 文 献

- 1) 古畑勝則, 小池和子: 防菌防黴, **18**, 407-410, 1990.
- 2) 古畑勝則, 松本淳彦: 東京衛研年報, **43**, 197-204, 1992.
- 3) 古畑勝則: 空気調和・衛生工学, **70**, 53-57, 1996.
- 4) 古畑勝則: 防菌防黴, **24**, 723-728, 1996.
- 5) 古畑勝則: 有害微生物管理技術第II巻, (株)フジ・テクノシステム, 東京, pp871-879, 2000.
- 6) Furuhashi, K., et al.,: *Biocontrol Sci.*, **13**: 33-39, 2008.
- 7) 日本微生物生態学会バイオフィルム研究部会編著: バイオフィルム入門, 日科技連, 東京, 2005.